

# Hallazgos histológicoultraestructurales característicos de las células madres (stem cell embriónico fetales). Primer reporte internacional.

## Ultra structural histologic findings characteristic of embryonic fetal stem cells. First international report.

Gustavo Rubio Coronel\*

Luis Geffner\*\*

Federico Benetti\*\*\*

### RESUMEN

Se buscó la evidencia de crecimiento muscular o biogénesis que debería haberse iniciado a partir del trasplante de Stem cell embriónico fetales de donantes con el propósito de observar los dos tipos de ADN distintos tanto del receptor como del donante. **Materiales y métodos:** esta investigación se realizó luego de recibir fragmentos de músculo cardíaco del ventrículo izquierdo en los cuales se implantaron dichas células directamente en el miocardio mediante 80 inyecciones de 1ml cada una en todas las paredes de ambos ventrículos, con especial énfasis en el izquierdo. Las biopsias fueron fijadas con glutaraldehído al 3%, post-fijadas con Tetraóxido de Osmio al 1%, deshidratadas en diversos gradientes ascendentes de alcohol etílico, preembedidas en Oxido de propileno, embebidas en resina Spurr para realizar los bloques, los cuales fueron cortados por ultramicrotomía, teñidas con acetato de uranilo y citrato de plomo, y finalmente observadas al Microscopio Electrónico de Transmisión JEOL- JEM 1010. **Resultados:** lo más relevante en esta investigación son los hallazgos encontrados en las mitocondrias que se presentaban hipertróficas, redondeadas con crestas vesiculares, siendo lo distintivo y el más importante hallazgo la presencia de una banda recta trilaminar con una estructura central electrodensa proteica, la misma que atraviesa perpendicularmente en toda la longitud de la mitocondria, formando una "Barra germinativa pluripotencial mitocondrial", hallazgo propio distintivo de las células Madre. **Conclusiones:** siendo en la mitocondria esta inusual barra recta transversal electrodensa un importante aporte científico distintivo que identificaría plenamente a las células transplantadas del tipo de Stem cell embriónico fetales, diferentes a las mitocondrias con crestas cortas irregulares onduladas paralelas vacías, dando con esto una diferenciación característica que determinaría su capacidad de ser pluripotencial y de autorenovación.

**Palabras clave:** Células stem embriónico fetal. Barra germinativa pluripotencial. Mitocondrial. Microscopía Electrónica.

### SUMMARY

We looked up an evidence of muscle growth or biogenesis that should have started from the transplant of embryonic fetal stem cells from donors in order to observe the two distinct AND types of both, the receptor and the donor. **Materials and methods:** this research was made after receiving fragments of the left ventricle cardiac muscle where those cells were implanted directly in the myocardio by means of 80 injections of 1 ml each in all the walls of both ventricles, with special stress in the left one. Biopsies were fixed with 3% glutaraldehído, post fixed with 1% Osmio Tetraoxide, dehydrated in different ascending gradients of ethyl alcohol, pre soaked in propylene oxide, soaked in Spurr resin to make the blocks which were cut by ultramicrotomy, dyed with uramil acetate and lead citrate, and finally observed at the JEOL – JEM 1010 Transmission Electronic Microscope. **Results:** the most outstanding facts in this research are the findings met in the mitochondrion that were hypertrophic, rounded with vesicular crests, and what makes difference and the most important finding is the presence of a tri-laminar straight strip with a central proteinic electrodense structure which crosses perpendicularly the mitochondrion in its whole length, giving form to a "Mitochondrial pluripotential germinative Bar" distinctive finding of stem cells. **Conclusions:** this unusual electrodense, transverse, straight bar is an important scientific contribution and a distinctive that would identify completely the transplanted stem cells embryonic fetal type, different from mitochondrion with short irregular wavy, parallel, empty crests, giving this way a characteristic differentiation that would determine their capability of being pluripotential and with self-renovation.

**Key words:** Embryonic fetal stem cells. Pluripotential germinative bar. Mitochondrial. Electronic microscopy.

198 \* Jefe del Laboratorio de Microscopía Electrónica, Instituto Nacional de Higiene "Leopoldo Izquieta Pérez" y MT. Catedrático de Anatomía Patológica – Facultad de Ciencias Médicas – Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, Ecuador.

\*\* Director del Servicio de Células Madre en el hospital "Luis Vernaza" – Guayaquil, Ecuador.

\*\*\* Cirujano Cardiorrástico, Director de la Fundación Benetti Internacional, hospital "Luis Vernaza" – Guayaquil.

## Introducción

Las células Madres (Stem cells) podemos definir las como aquellas células dotadas simultáneamente de la capacidad de autorrenovación<sup>2</sup> (reproducción de nuevas células madres) y de originar células hijas comprometidas en determinadas rutas de desarrollo que tiene la capacidad de convertirse y finalmente diferenciarse en tipos celulares especializados<sup>1</sup>. En el contexto de la actual investigación se pretende obtener la evidencia de crecimiento muscular o miogénesis la que debería haberse iniciado a partir de los implantes (cuatro meses previos) al transplantarse stem cell embriónico fetales en un paciente que padecía de miocardiopatía dilatada que lo llevó a insuficiencia cardiaca congestiva<sup>7</sup>.

El objetivo fue tratar de obtener los resultados para diferenciar los dos tipos de ADN del receptor y del donante, teniendo vital importancia al ser un hecho inédito en la historia de la medicina y de comprender las nuevas terapias de cultivo y trasplante de células madre<sup>8</sup> que sirviéndose de su capacidad natural de regeneración y con la ayuda de técnicas de trasplante desarrollados en los últimos años, se abra como una posibilidad para el tratamiento de enfermedades degenerativas<sup>3</sup>.

## Materiales y métodos

El actual estudio parte de la obtención de muestras de corazón perteneciente a un paciente de sexo masculino que sobrevivió cuatro meses y medio, pero por su avanzado estado de insuficiencia cardiaca congestiva por miocardiopatía dilatada, se planteó conocer con el estudio de las biopsias miocárdicas la diferenciación de los dos tipos de ADN del receptor y del donante. Las biopsias fueron tomadas del miocardio del ventrículo izquierdo sitio en el cual se inocularon los trasplantes de stem cell embriónico fetal. Estas inoculaciones consistieron en 80 inyecciones de 1ml cada una en todas las paredes libres de ambos ventrículos con especial énfasis en el ventrículo izquierdo, donde trataron de distribuirlo de la manera más extendida posible<sup>9</sup>. Las biopsias fueron prefijadas en glutaraldehído al 3%, posfijadas en tetraóxido de osmio al 1%, deshidratadas en gradientes ascendentes de alcohol

etílico de 50%, 70%, 90%, 95% y 100%, incluidas en óxido de propileno y embebidas en resina sintética Spurr para posteriormente realizar bloques polimerizados, procediéndose posteriormente a los cortes histológicos ultrafinos utilizando un ultramicrotomo Leica obteniendo un grosor de 50um o nm, procediéndose luego a la tinción con acetato de uranilo y citrato de plomo, para ser finalmente observadas en mallas de cobre al microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 1010.

## Resultados

Se procedió a analizar 60 cortes seriados ultrafinos histológicos de las biopsias miocárdicas, encontrándose que estaba compuesto el músculo estriado cardíaco con áreas cicatrizales fibrosas miocárdicas irregulares. En otras áreas las fibras hipertróficas contenían pigmentos de hemosiderina acompañado de angiogénesis<sup>10</sup>.

La fibrosis intersticial correspondía a pequeñas cicatrices por sustitución, por reparación de infarto isquémico o necrosis coagulativa previa de los miocitos<sup>10</sup>.

El tamaño de los sarcoplasmas individualmente son muy variables desde atenuados a elongados, llegando algunos a hipertrofia. Sus núcleos en posición central están aumentados de tamaño de contornos irregulares y fusiformes<sup>10</sup>. Figura 1.

**Figura 1**

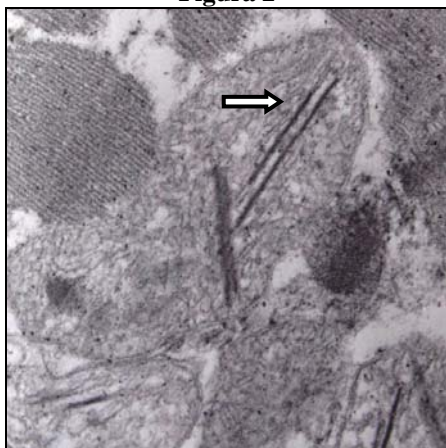


Micrografía electrónica de transmisión con corte longitudinal de fibra muscular cardíaca o cardiomiocito en cuya parte central contiene un núcleo fusiforme rodeado por mitocondrias y discos intercalares. MAG. 5000 x. JEOL JEM 1010.

**Fuente:** laboratorio de microscopía electrónica, instituto nacional de higiene "Leopoldo Izquieta Pérez".

Cabe destacar entre lo más relevante en el hallazgo ultraestructural, la presencia de mitocondrias hipertrofiadas ovaladas con crestas paralelas y vesiculares edematosas además de apariencia característica en la célula madre, cual es una banda inusual gruesa trilaminar que atraviesa a la mitocondria en toda su longitud de polo a polo en un número de uno a tres<sup>5</sup>. Teniendo una longitud que va de 200 a 400nm. y un grosor de 30 a 50nm. formado por dos bandas electrolúcidas laterales de 10 a 15nm de espesor, y una banda electrodensa central con un espesor de 20 a 30nm. contenido estriaciones periódicas. Figura 2.

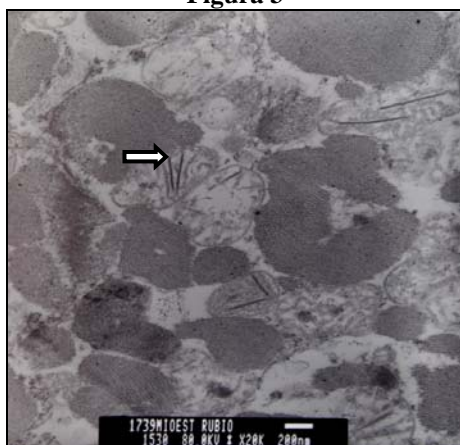
**Figura 2**



Micrografía electrónica de transmisión de una célula madre con su característica "banda germinativa pluripotencial mitocondrial" (flecha). MAG. 28000x. JEOL JEM 1010.

**Fuente:** laboratorio de microscopía electrónica, instituto nacional de higiene "Leopoldo Izquieta Pérez".

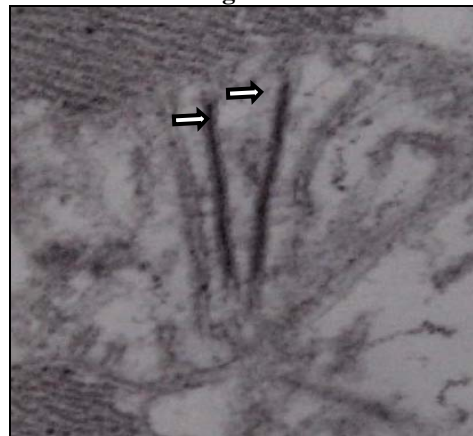
**Figura 3**



Mitocondrias de célula madre cuya banda germinativa pluripotencial mitocondrial cuyo material electrón-denso centrada origen a nuevas fibras musculares cardíacas. MAG. 20000 x. Microscópico electrónico de transmisión. JEOL JEM 1010.

**Fuente:** laboratorio de microscopía electrónica, instituto nacional de higiene "Leopoldo Izquieta Pérez".

**Figura 4**

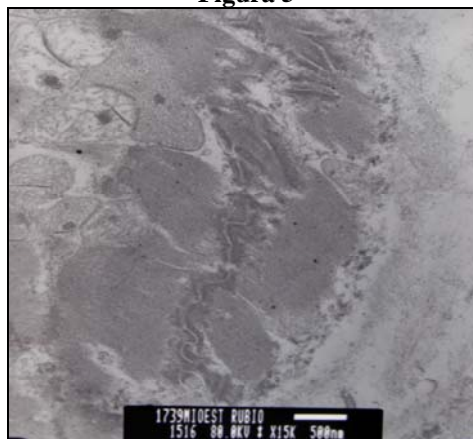


Micrografía electrónica de transmisión, con mayor ampliación de la foto 3, mostrando la evidencia de la extravasación del contenido proteico de la barra germinativa hacia el intersticio o plasmalema de los discos intercalares, diferenciándose a fibras musculares estriadas cardíacas. Se observa ruptura de la membrana externa. MAG. 28000x. JEOL JEM 1010.

**Fuente:** laboratorio de microscopía electrónica, instituto nacional de higiene "Leopoldo Izquieta Pérez".

El contenido central electrodenso es vertido al espacio de la sarcómera dando lugar a diferenciarse a la línea celular miocárdica endodérmica originando células hijas comprometidas en determinada ruta de desarrollo con capacidad a convertirse y diferenciarse en este tipo sarcoplásmico celular especializado<sup>9</sup>. Figura 5.

**Figura 5**



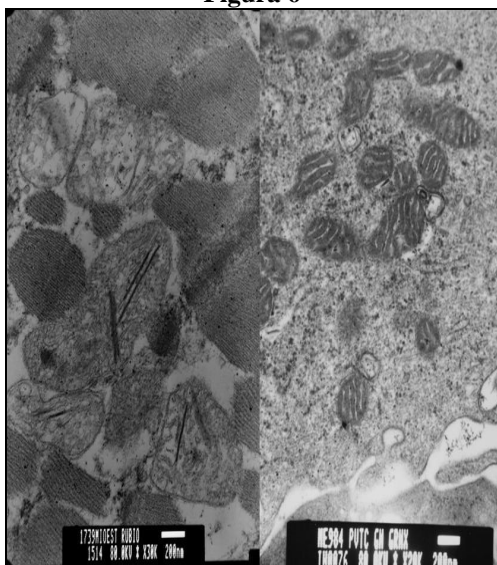
Micrografía electrónica de transmisión; se observa la formación de bandas escaleriformes de Eberth o discos intercalares que tienen disposiciones irregulares en la parte central de las fibras miocárdicas. MAG. 15000x. JEOL JEM 1010.

**Fuente:** laboratorio de microscopía electrónica, instituto nacional de higiene "Leopoldo Izquieta Pérez".

En otra área se observa la formación de bandas escaleriformes de Eberth o discos intercalares con

sus fasciae adherentes, maculae adherentes (desmosoma) y nexos (uniones de hendidura) que tienen disposiciones irregulares en la parte central de ciertos paquetes de fibras miocárdicas; además se observan esbozos de miofilamentos y organelas sarcoplásmicas mal organizadas dentro de las miofibrillas probablemente debido a una incompleta o mala diferenciación en esta área de células transplantadas de Stem cell embrionaria fetal<sup>11</sup>. Figura 6.

**Figura 6**



Obsérvese las mitocondrias de una célula adulta normal (derecha) en relación con las mitocondrias de una célula madre (izquierda) que presenta la característica "Banda germinativa pluripotencial mitocondrial". MAG. 20000 x. Microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 1010  
**Fuente:** laboratorio de microscopía electrónica, instituto nacional de higiene "Leopoldo Izquieta Pérez".

## Discusión

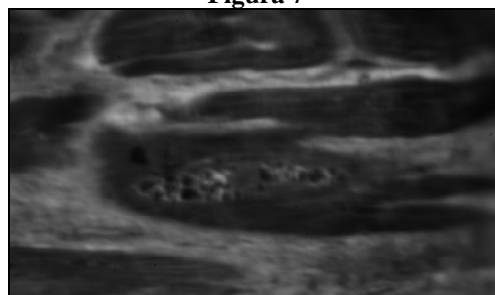
Con esta comprobación se podría valorar la capacidad de dichas células Madres o Stem cells embrionarias fetales para continuar con la aplicación de:

1. El empleo de células madres o sus derivados para terapias celulares<sup>14</sup>.
2. El empleo en la reparación de tejidos dañados porcentualmente viables con una buena angiogénesis<sup>6</sup>.
3. Aplicable para el diseño de nuevos medicamentos<sup>4</sup>.

Mediante las biopsias se podría valorar y establecer con este característico hallazgo

histológico ultraestructural, si las inoculadas células madres obtenidas de los blastocistos en la capa superficial de los trofoblastos cuando se extrae células de la masa celular interna (mci) del blastocisto<sup>6</sup> al implantarse se adaptaron y por su capacidad pluripotencial se diferenciaron hacia fibras miocárdicas neoformadas, que fueron valoradas por estos hallazgos y su angiogénesis. Marcan estos nuevos descubrimientos, una línea primordial en el campo de las nuevas terapias en la medicina. Aunque si hubo la miogénesis focal en el sitio de mejor irrigación sanguínea, la avanzada dilatación cardíaca, la disfunción contráctil progresiva o los efectos tóxicos (alcoholismo) y los infartos previos, con la escasa angiogénesis o irrigación sanguínea escasa, con un porcentaje alto de fibrosis intersticial y endocárdica o área cicatrizales, son factores que impidieron la miogénesis o crecimiento miocárdico esperado. Figuras 7 y 8.

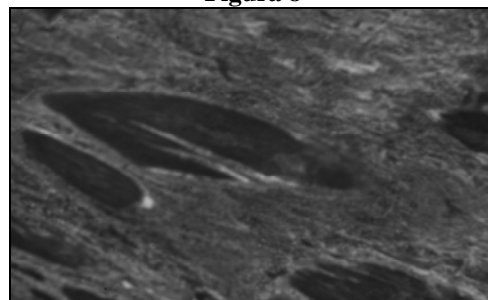
**Figura 7**



Microscopía óptica con músculo cardíaco (miocárdico) de ventrículo izquierdo analizado por MET irrigado con vena con eritrocitos, sitio satisfactorio para implante, en el que se seleccionó e identificó las células stem cell embrionarias con su hallazgo histológico ultraestructural antes mencionado, Mag 80X.

**Fuente:** laboratorio de microscopía electrónica, instituto nacional de higiene "Leopoldo Izquieta Pérez".

**Figura 8**



Miocardio de ventrículo izquierdo con amplias áreas cicatrizales fibroblásticas sin irrigación sanguínea, sitio inadecuado de transplante de las stem cell embrionarias, Mag 80X.

**Fuente:** Laboratorio de microscopía electrónica, instituto nacional de higiene "Leopoldo Izquieta Pérez".

## Conclusión

Las mitocondrias son gránulos citoplasmáticos pequeños en forma de bastón o de filamento, que intervienen en la respiración y metabolismo celulares, proporcionando la principal fuente de energía mediante la síntesis de ATP<sup>13,15</sup>.

Las células Madre contienen característicamente la "**Banda germinativa pluripotencial mitocondrial**" que ha sido encontrada, dando lugar a la comprobación de la efectividad de la multiplicación pluripotente y la capacidad de autorrenovación al demostrarse que la banda interna, con contenido proteico, emerge al intersticio, formando de manera diferenciada las características fibras musculares cardiacas tomando la diferenciación al encontrarse incluidas dentro de las fibras miocárdicas por estímulos bioquímicos enzimáticos para derivar a la diferenciación específica al tener su propio ADN ARN polimerasa y su ARN de transferencia y ribosomas<sup>15</sup>.

También contienen enzimas que intervienen en el transporte de electrones, comprobándose así que están dotadas de las propiedades pluripotenciales y de autorrenovación<sup>12</sup>.

## Referencias bibliográficas

1. Anversa, P. et al: Concise Review: Stem Cells, Myocardial Regeneration, and Methodological Artifacts. *Stem Cells*; 25;589-601, 2007.
2. Bethesda et al: Can Stem Cells Repair a Damaged Heart?. In *Stem Cell Information*. National Institutes of Health - U.S. Department of Health and Human Services, 2006.
3. Bethesda: *Stem Cell Basics: Introduction*. National Institutes of Health - U.S. Department of Health and Human Services. 2006.
4. Dirección general de investigación: Células madre, la terapia del futuro?. Comisión europea. 2001.
5. Kühnel, W.: Atlas color de citología e histología, 11° Edición, Págs. 172-178, Editorial Panamericana, 2002.
6. Nombela, C: Células madre, encrucijadas biológicas para la Medicina. Edaf. Madrid – España. ISBN 978-84-414-1823-3. 2007.
7. Lee M., Makkar R: Stem-Cell Transplantation in Myocardial Infarction: A Status Report. *Ann Intern Med.*; 140:729-737, 2004.
8. Lee, M. et al: Stem-cell transplantation in myocardial infarction. *American College of physicians* 2004.
9. Leri, A et al: Concise review: stem cells and myocardial regeneration. *Stem Cells* 2007; 25; 589-601.
10. Robbins y Cotran > Patología estructural y funcional, 7ª Edición, págs. 606 – 610, Editorial Elsevier, 2004.
11. Ross, M.; Kaye, G.: Histología, texto y atlas color con biología celular y molecular, 4ª Edición, Págs. 345 – 351, Editorial médica panamericana, 2005.
12. Science Daily: Discovery Of Cardiac Stem Cells May Advance Regenerative Heart Therapy. 2006.
13. Stevens, A; Lowe, J.: Histología humana, 2º Edición, Editorial Mosby, 1998.
14. Tinoco C. et al: Evaluation of myocardial stress perfusion imaging after stem cell therapy in patients with advanced left ventricular dysfunction. *Alasbimn Journal*. 2003.
15. Weiss, L.: Cell and tissue biology, Editorial Urban & Schwarzenberg, Alemania, 1988.

**Dr. Gustavo Rubio Coronel**

**Teléfonos: 593-09-9480647**

**Correo electrónico: drgrubio@yahoo.com**

**Fecha de presentación: 12 de abril de 2008**

**Fecha de publicación: 30 de junio de 2008**

**Traducido por: Dr. Gonzalo Clavijo.**